

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-186158

(43)Date of publication of application : 02.07.1992

(51)Int.Cl.

G01N 33/543

(21)Application number : 02-314105

(71)Applicant : KONICA CORP

(22)Date of filing : 21.11.1990

(72)Inventor : TAKAHASHI TAKENORI

UEMURA MORITO

ITO TSUKASA

MATSUMOTO SHINJI

## (54) IMMUNITY MEASURING METHOD

### (57)Abstract:

**PURPOSE:** To quantify the components with good sensitivity, accuracy, preciseness, and reproducibility through simple procedures by segregating reaction products having formed bonds with particulates, turned insoluble, through immunity reactions, and measuring an ID body in non-reaction object by a dry type analyzing element.

**CONSTITUTION:** In case a substance to be measured is a high-polymer, specific components in the specimen are analyzed by the non-uniform series immunity measuring method. Therein particulates turned insoluble in which the anti-body (or antigen) is bound with a bearer, are touched with and make immunity reaction with the anti-body identified by the antigen (or anti-body) in the specimen and enzyme. The resultant is subjected to B/F segregation, and a certain quantity of liquid phase including ID body existing in free state out of bond with the insoluble particulates is dripped onto a dry type analyzing element, and the enzyme activeness of the enzyme ID body is measured by this dry type analyzing element. Thus the antigen in specimen can be quantified with good sensitivity, accuracy, precoseness, and reproducibility through simple procedures.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

## ⑫ 公開特許公報(A) 平4-186158

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)7月2日

G 01 N 33/543

A  
J7906-2 J  
7906-2 J

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全 13 頁)

⑭ 発明の名称 免疫測定方法

⑰ 特 願 平2-314105

⑱ 出 願 平2(1990)11月21日

⑲ 発 明 者	高 橋 壮 模	東京都日野市さくら町1番地	コニカ株式会社内
⑲ 発 明 者	植 村 盛 人	東京都日野市さくら町1番地	コニカ株式会社内
⑲ 発 明 者	伊 藤 司	東京都日野市さくら町1番地	コニカ株式会社内
⑲ 発 明 者	松 本 晋 治	東京都日野市さくら町1番地	コニカ株式会社内
⑲ 出 願 人	コニカ株式会社	東京都新宿区西新宿1丁目26番2号	
⑲ 代 理 人	弁理士 宇高 克己		

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

免疫測定方法

## 2. 特許請求の範囲

非均一系免疫測定法を用いて試料中の特定成分を分析する方法であって、抗体（又は抗原）が結合された不溶化微粒子、試料中の抗原（又は抗体）、及び標識された抗体（又は抗原）を接触、免疫反応させ、前記不溶化微粒子と結合した反応生成物と非反応物とを分離した後、前記不溶化微粒子と結合していない非反応物における標識体を乾式分析素子で測定することにより、試料中の抗原（又は抗体）を分析することを特徴とする免疫測定方法。

## 3. 発明の詳細な説明

## 【産業上の利用分野】

本発明は、流体試料中の微量成分、特に生物学的流体試料中の特定微量成分を測定する方法に関するものである。

## 【発明の背景】

生物学的流体試料中に極微量含有される物質を検出する方法として、各種の分析法が開発されて来ている。この分析法の一つとして、免疫反応をその原理とするものがある。そして、この原理を用いた測定法として種々のものが開発され、精度の高いものとして知られている。

すなわち、1958年にベルソン(Berson)とイアロウ(Yalow)が、1951で標識した牛インシュリンと糖尿病患者血清中の抗インシュリン抗体を用いて、血清中のインシュリンを測定することに成功して以来、ラジオアイソトープを用いた免疫測定法が広く用いられて来た。

そして、これ以後、標識物質として放射性同位元素以外のものも種々開発されて来た。例えば、酵素、酵素基質、補酵素、酵素阻害物質、バクテリオファージ、循環反応体、金属及び有機金属の錯体、有機補欠分子族、化学発光性反応体及び蛍光性分子等が挙げられる。

免疫測定法は、均一免疫測定法と非均一免疫測定法に大別される。すなわち、抗原抗体反応生成

物(Bound体)と非反応物(Free体)の分離(B/F分離)が必要な非均一免疫測定法と、B/F分離の必要のない均一免疫測定法とに大別される。このうち、測定対象物質が高分子である場合には、B/F分離が必要な非均一免疫測定法が利用されている。

ところで、この非均一免疫測定法は洗浄操作、試薬の調整が必要であること、標識物質、基質、反応停止液等の添加が必要であることから操作が煩雑であること、さらには、一般に、免疫反応は長時間を要し、測定時間が長くなること等の問題がある。

これらの問題点に対して各種の技術が提案されている。例えば、特開昭64-63863号公報、特開昭64-63864号公報、特開平2-8344号公報においては、乾式分析素子を用いることにより、操作性は簡便になっているが、免疫反応については改良されておらず、測定に長時間を要するという問題がある。又、特開平2-2070号の技術においては、不溶化微粒子による妨害

(2)

があり、精度などの点において問題点が残されている。

#### 【発明の開示】

本発明の目的は、液体試料中の特定成分を、簡便な操作で、感度、正確度、精度及び再現性良く定量できる技術を提供することである。

この本発明の目的は、非均一系免疫測定法を用いて試料中の特定成分を分析する方法であって、抗体(又は抗原)が結合された不溶化微粒子、試料中の抗原(又は抗体)、及び標識された抗体(又は抗原)を接触、免疫反応させ、前記不溶化微粒子と結合した反応生成物と非反応物とを分離した後、前記不溶化微粒子と結合していない非反応物における標識体を乾式分析素子で測定することにより、試料中の抗原(又は抗体)を分析することを特徴とする免疫測定方法によって達成される。

例えば、抗体(又は抗原)を粒径2mm以下、好ましくは0.1~300 $\mu$ mの微粒子の担体に化学的及び/又は物理的に結合させ、不溶化微粒

- 3 -

子抗体(又は不溶化微粒子抗原)を得、これと酵素で標識された抗体(又は抗原)及び試料とを接触、免疫反応させ、B/F分離した後、不溶化微粒子抗体(又は不溶化微粒子抗原)に結合しないで遊離の状態で存在する標識体を含む液相の一定量を乾式分析素子上に滴下し、酵素標識体の酵素活性を乾式分析素子で測定することにより、試料中の抗原(又は抗体)が簡便な操作で、感度、正確度、精度及び再現性良く定量できたのである。

本発明において、試料としてはあらゆる形態の溶液、コロイド溶液などが使用しうるが、好ましくは生物由来の液体試料、例えば血液、血漿、血清、脳脊髄液、唾液、羊水、乳、尿、汗、肉汁等が挙げられる。

本発明により測定しうる液体試料中での特定成分とは、その特定成分に特異的に結合する物質が存在しうる物質(物質群)である。すなわち、ポリペプチド、蛋白質、複合蛋白質、多糖類、脂質、複合脂質、核酸、ホルモン類、ビタミン類、薬剤、抗生物質、農薬等が挙げられる。具体的には、特

4

開昭62-90539号公報や特開昭63-131062号公報に記載の物質(物質群)を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

本発明に用いられる標識体としては、例えば、酵素、酵素基質、酵素及び酵素前駆体の活性を変化させる物質(酵素阻害物質、補欠分子族、補酵素)、酵素前駆体、アポ酵素、発光物質などが挙げられる。

具体的な物質としては、特開昭62-90539号公報などに記載のものが挙げられるが、好ましくは酵素、又は発光物質であり、さらに好ましくは $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルクノートデヒドロゲナーゼ、アミラーゼなどの酵素である。

これらの酵素を標識物質とする場合、酵素反応系、発色系は公知のものを使用できる。具体的には、特開昭61-292060号公報、特開昭62-90539号公報、特開昭63-13106

- 5 -

6

2号公報、特開昭63-45562号公報、特願昭63-219893号明細書に記載の物質(物質群)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

そして、これら標識物質の抗体(抗原)への結合は、当業者間で知られている公知の試薬と方法で行うことができ、例えば石川 榮治、河合 出、宮井 潔 編「酵素免疫測定法(第2版)、医学書院、1978年」や日本臨床病理学会編「臨床病理」臨時増刊特集第53号「臨床検査の爲のイムノアッセイ技術と応用」、臨床病理刊行会、1983年」などに記載された方法を参考にすることができる。

本発明で使用される抗体は、その由来を特に限定されるものではなく、哺乳動物等に抗原を投与、免疫して得られる抗血清、腹水液をそのままか、あるいは従来公知の方法である硫酸ナトリウム沈澱法、硫酸アンモニウム沈澱法、セファデックスゲルによるゲル濾過法、イオン交換セルロースクロマトグラフィ法、電気泳動法等(右田俊介編

(3)「免疫化学」中山書店pp74~88参照)で精製して用いることができる。

あるいは、抗原で感染した哺乳動物など(例えばマウス)の脾臓細胞や骨髓腫細胞(ミエローマ)から雑種細胞(ハイブリドーマ)を得てモノクローナル抗体を作成し、これを特定成分と特異的に結合しうる物質として使用すると特異性が向上し、好ましい。

又、これらの抗体はIgG、IgM、IgA、IgD、IgE各分画を用いることができ、或いはこれらの抗体を酵素処理してFab、Fab'又はF(ab')<sub>2</sub>といった活性抗体フラグメントにして使用しても良い。さらに、これらの抗体は単一で使用しても、複数の抗体を組み合わせ使用しても良い。

本発明の免疫測定方法による反応型式としては、競合法、2抗体法、サンドイッチ法などが挙げられるが、特に限定はされない。又、他の生物活性物質(例えば、ビオチン、アビジン)を利用した免疫測定方法も適用できる。

- 7 -

本発明においては、液体試料中の特定成分を測定するのに反応型式として免疫反応を挙げているが、免疫反応に準ずる生物活性を示す物質の特異反応(本明細書では、この特異反応も免疫反応に包含)を利用することも可能である。この特異的に結合する物質の組み合わせとしては、次のようなものが挙げられる。

酵素と基質(生成物)

酵素と阻害剤

酵素と補欠分子族

酵素と補酵素

酵素とアロステリックエフェクター

抗体と抗原

抗体とプロテインA

レクチンと多糖類

レクチンと糖タンパク質

核酸と相補性の塩基配列

核酸とヒストン

核酸と核酸

核酸とポリメラーゼ

ホルモンと受容体

ビオチンとアビジン(ストレプトアビジン)

ビオチシンとアビジン ( " )

デスチオビオチンとアビジン ( " )

オキシビオチンとアビジン ( " )

本発明で使用する抗原は特異抗体と反応するものであり、ハプテン及びその誘導体を含有する。

抗体(又は抗原)を結合させる不溶化担体としては、その大きさが2mm以下の粒状体が好ましく、より好ましくは0.1μm~300μmのサイズの微粒子又は粉砕物である。

不溶化担体(微粒子)の材料としては、アガロース、セルロース、架橋デキストラン、ポリアクリルアミド、セルロース、微結晶セルロース、架橋アガロース、架橋ポリアクリルアミド、ガラス、シリカゲル、ケイ酸土、二酸化チタン、硫酸バリウム、酸化亜鉛、酸化鉛、ケイ砂、ポリスチレン等の各種の合成樹脂のほか、後述する多孔質層の素材、さらには磁性微粒子が利用できる。

好ましくはアガロース、架橋アガロース、架橋

- 8 -

(4)

醱酵物、コラーゲン及びそれらの分解物質等が挙げられる。

又、上記の非特異吸着抑制蛋白質は、不溶化担体に担持させるだけでなく、免疫反応時に、その一定量を免疫反応溶液中に添加することにより、一層非特異吸着の抑制効果上がる。

B/F分離は、フィルターを用いての濾過手段、遠心分離手段などで行え、又、不溶化担体として磁性微粒子が用いられた場合には磁気的な分離手段を用いることもできる。好ましくは瞬時にB/F分離可能なフィルター濾過手段である。

本発明に用いる乾式分析素子は、少なくとも一層以上の多孔質層を持つことが好ましい。

多孔質層の素材は特に限定されないが、好ましい例としてはサイズ1〜350 $\mu$ mの粒状体あるいは40〜400メッシュの繊維から一つ以上選ばれた素材により構成される構造体が挙げられる。該粒状体の材料としては、ケイ素土、二酸化チタン、硫酸バリウム、酸化亜鉛、酸化鉛、微結晶セルロース、ケイ砂、ガラス、シリカゲル、架橋ポ

デキストラン、ポリアクリルアミド、架橋ポリアクリルアミド、ガラス、シリカゲル、ポリスチレン、セルロース、微結晶セルロース等であり、更に好ましくはポリアクリルアミド、架橋ポリアクリルアミド、ポリスチレン、微結晶セルロース等である。

上記不溶化担体は数種を混合して用いても良い。

抗体又は抗原は、これら不溶化担体に、当業者で公知の方法で化学的及び/又は物理的に直接、あるいは間接的に結合させることができる。

結合法については1976年、講談社発行、千畑一郎ほか2名編「実験と応用 アフィニティクロマトグラフィー」(第1刷)、1975年、講談社発行、山崎 誠ほか2名編「アフィニティクロマトグラフィー」(第1版)を参考にできる。

結合反応後、標識抗体(又は抗原)の非特異反応を排除する目的で、測定すべき特異的反応に関与しない蛋白質を担持させることができる。それらの代表的な例としては、哺乳動物及び鳥類の正常血清蛋白質、アルブミン、スキムミルク、乳酸

- 11 -

12

キストリン、架橋ポリアクリルアミド、アガロース、架橋アガロース、ポリスチレン等の各種の合成樹脂のほか、次のような反応性基を持つ化合物から成る自己結合型粒子が挙げられる。

#### 例示化合物

- (1) ポリ(スチレン-コ-グリシジルメタクリレート) [90/10]
- (2) ポリ(スチレン-コ-メチルアクリレート-コ-グリシジルメタクリレート) [80/15/5]
- (3) ポリ(スチレン-コ-ブチルメタクリレート-コ-グリシジルメタクリレート) [75/15/10]
- (4) ポリ(スチレン-コ-ビニルベンジクロライド-コ-グリシジルメタクリレート) [80/10/10]
- (5) ポリ(スチレン-コ-ジビニルベンゼン-コ-グリシジルメタクリレート) [90/2/8]
- (6) ポリ(p-ビニルトルエン-コ-グリシ

- ジメタクリレート) [90/10]
- (7) ポリ(メチルメタクリレート-コ-グリシジメタクリレート) [80/20]
- (8) ポリ(スチレン-コ-N-, N-ジメチルアミノエチルメタクリレート) [95/5]
- (9) ポリ(スチレン-コ-アジリジニルエチルメタクリレート) [95/5]
- (10) ポリ(スチレン-コ-メチルアクリレート-コ-アクロレイン) [90/5/5]
- (11) ポリ(スチレン-コ-アクリルアミド) [95/5]
- (12) ポリ(スチレン-コ-ビニルチオール) [95/5]
- (13) ポリ(スチレン-コ-N-メチロールアクリルアミド) [95/5]
- (14) ポリ(スチレン-コ-1,3-ブチルアクリレート-コ-グリシジルメタクリレート) [95/5/5]
- (15) ポリ(スチレン-コ-ビニルイソシアネート) [95/5]

13

14

- (16) ポリ(メチルアクリレート-コースチレン-  
ン-コ-N-メチロールアクリルアミド)  
(50/35/15)
- (17) ポリ(スチレン-コ-グリシジルメタクリ  
レート-コ-N, N-ジメチルアミノ  
エチルメタクリレート) (90/5/5)
- (18) ポリ(スチレン-コ-メタクリル酸-コ  
-アクリルアミド) (95/2/3)
- (19) ポリ(スチレン-コ-N-メチロールア  
クリルアミド-コ-メトキシエチルアク  
リレート) (90/5/5)
- (20) ポリ(p-ビニルトルエン-コ-N-メ  
チロールアクリルアミド-コ-アクリル  
酸) (90/8/2)
- (21) ポリ(メチルメタクリレート-コ-グリ  
シジルメタクリレート-コ-1-ブチル  
アクリレート) (80/10/10)
- (22) ポリ(スチレン-コ-p-ビニルベンジ  
ルクロライド-コ-アクリル酸-コ-ウ  
レイドエチルアクリレート)

- 1 5 -

- (30) ポリ(p-ビニルトルエン-コ-1-ブ  
チルアクリレート) (95/5)
- (31) ポリ(メチルアクリレート-コ-メタク  
リルアミド) (95/5)
- (32) ポリ(スチレン-コ-N-メチロールア  
クリルアミド) (95/5)
- (33) ポリ(p-ビニルベンジルクロライド-  
コ-N-メチロールアクリルアミド)  
(96/4)
- (34) ポリ(スチレン-コ-イタコン酸)  
(98/2)
- (35) ポリ(スチレン-コ-1-ブチルアクリ  
レート) (92/8)
- (36) ポリ(メチルアクリレート-コースチレ  
ン-コ-アクロレイン) (30/65/5)
- (37) ポリ(メチルメタクリレート-コースチ  
レン-コ-2-ヒドロキシエチルメタク  
リレート) (25/70/5)
- (38) ポリ(スチレン-コ-ビニルスルホニル  
エチルアクリレート) (80/20)

- 1 7 -

- (5) (75/10/5/10)
- (23) ポリ(スチレン-コ-メタクロレイン-  
コ- $\alpha$ -ヒドロキシエチルメタクリレ  
ート) (90/5/5)
- (24) ポリ(スチレン-コ-アクロレイン-コ  
-アセトアセトキシエチルメタクリレ  
ート) (85/5/10)
- (25) ポリ(スチレン-コ-N, N-ジメチル  
アミノエチルアクリレート-コ-ビニル  
スルホニルエチルメタクリレート)  
(90/5/5)
- (26) ポリ(p-ビニルトルエン-コ-アミノ  
スチレン-コ-ビニルスルホニルエチル  
メタクリレート) (85/10/5)
- (27) ポリ(スチレン-コ-N, N-ジメチル  
アミノエチルメタクリレート) (9/10)
- (28) ポリ(スチレン-コ-アクリル酸)  
(97/3)
- (29) ポリ(スチレン-コ-アクリルアミド)  
(97/3)

- 1 6 -

- (39) ポリ(スチレン-コ-N, N-ジメチル  
アミノエチルアクリレート) (90/10)
- (40) ポリ(スチレン-コ-メチルアクリレ  
ート-コ-アセトアセトキシエチルアクリ  
レート) (90/5/5)
- (41) ポリ(スチレン-コ-メタクリル酸)  
(95/5)

尚、各例示化合物の後の括弧内は重合反応に用  
いられた単量体の重量%を示す。

これらの粒子数種を混合して用いることもでき  
る。

又、多孔質層に用いる繊維としては、パルプ、  
粉末濾紙、綿、麻、絹、羊毛、キチン、キトサン、  
セルロースエステル、ビスコースレーヨン、銅ア  
ンモニアレーヨン、ポリアミド(6-ナイロン、  
6, 6-ナイロン、6, 10-ナイロン等)、ポ  
リエステル(ポリエチレンテレフタレート等)、  
ポリオレフィン(ポリプロピレン、ビニロン等)、  
ガラス繊維、石棉などの植物性、動物性、合成、  
半合成、再生繊維を用いることができ、あるいは

1 8

これらを混合して用いても良い。あるいは別の態様としては吸水性の洋紙、和紙、濾紙、ブラッシュポリマー、あるいはガラス繊維、鉱物性繊維（石棉など）、植物性繊維（木綿、麻、パルプ等）、動物性繊維（羊毛、絹など）、合成繊維（各種ナイロン、ビニロン、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン等）、再生繊維（レーヨン、セルロースエステル等）などを単独あるいは混合して製造した織物、不織布、合成紙などを該多孔質層に用いることもできる。

このような粒状体、繊維、あるいは粒状体と繊維の混合物を塗布及び／又は製膜することにより、自由に接触し得る相互連絡空隙孔を有する多孔性構造が存在する多孔質層を形成する。自己結合性を有しない粒子は適当な接着剤を用いて粒子同志が点接着する形で製膜することができ、例えば特開昭49-53888号公報、特開昭55-90859号公報、特開昭57-67860号公報に記載の方法を適用することができる。自己結合性を有する有親ポリマー粒子は特開昭57-101

(6)

760号公報、特開昭57-101761号公報、特開昭58-70163号公報に記載の方法により同様に製膜できる。繊維又は繊維及び粒子の混合物については特開昭57-125847号公報、特開昭57-197466号公報に記載された繊維分散液を塗布することにより多孔質層を形成できる。又、特開昭60-173471号公報で行われている方法のようにゼラチンやポリビニルピロリドンのような水溶性バインダーを使用した繊維分散液を塗布することも可能である。又、このときのバインダーは水溶性に限らず、疏水性のバインダーの使用も可能である。このような分散液を製造する為には、多くの方法を単独又は組み合わせる用いることが可能である。例えば、有用な方法の一つとして、界面活性剤を液体キャリアへ添加し、粒状体及び／又は繊維の分散液中に分布及び安定化を促進することができる。

使用可能な代表的な界面活性剤の例としては、トライトンX-100（ロームアンドハース社製；オクチルフェノキシポリエトキシエタノー

- 19 -

ル）、サーファクタント10G（オリーン社製；ノニルフェノキシポリグリンドール）等の非イオン性界面活性剤がある。

上記界面活性剤は広範に選択された量を用いることが可能であるが、粒状体及び／又は繊維の重量に対して0.005～10重量%、好ましくは0.15～6重量%用いることができる。更に、別の方法として、該粒子単位と液体キャリアの音波処理、物理的混合、及び物理的攪拌処理、pH調整がある。これらは前記の方法と組み合わせることにより、更に有用である。

標識抗体又は抗原の非特異的反応を排除する目的で、測定すべき特異的反応に関与しない蛋白質を担持することが可能である。それらの代表的な例としては、哺乳動物の正常血清蛋白質、アルブミン、スキムミルク、乳酸菌菌物、コラーゲン、ゼラチン及びそれらの分解物等が挙げられる。

このような固定化操作は、前述の粒状体あるいは繊維にあらかじめ行っておいた後、多孔質層を形成しても良く、あるいは多孔質層を形成した後

に該固定化操作を行うことも可能である。

乾式分析素子の形態は分析を行いうるものであればよく、特に制限されるものではないが、製造上及び測定操作上、フィルム状あるいはシート状であることが好ましい。

乾式分析素子は一層から成っていても、多層から成っていてもよい。

例えば、基質を内蔵した多孔質層のみからなるものとか、吸水層上に多孔質層（基質が少なくともどちらかの層に内蔵）が設けられてなるものとか、吸水層上に複数の多孔質層（基質が少なくとも何れかの層に内蔵）が設けられてなるものとかが考えられ、必要に応じて、それらは光透過性支持体上に設けられたり、光反射性支持体上に設けられたり、光透過性支持体上に設けられ、その上に光反射性層が設けられたりする。

尚、吸水層の素材としては、例えばゼラチン、フタル化ゼラチン等のゼラチン誘導体、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルイミダゾール、ポリアクリルアミド、ポリアク

- 21 -

- 22 -

リル酸ナトリウム等の合成高分子、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム塩などのセルロース誘導体の多糖類などが挙げられる。好ましくは、ゼラチン、フクル化ゼラチン等のゼラチン誘導体である。

光透過性支持体の素材としては、例えば酢酸セルロース、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート及びポリビニル化合物（例えばポリスチレン）のような透明高分子化合物あるいはガラスのような透明無機化合物が挙げられる。

光反射性支持体の素材としては、例えばセラミックス、金属、あるいは樹脂被覆された紙などが挙げられ、必要に応じてこれらの素材中にはTiO<sub>2</sub>、BaSO<sub>4</sub>、マイカなどの白色顔料などを含有又は塗布させたものでも良い。

そして、例えば光透過性支持体上に基質を内蔵した多孔質層が設けられてなる乾式分析素子が用いられる場合には、試料は多孔質層側から滴下されるが、信号の測定は両側から可能であり、光反射性支持体上に基質を内蔵した多孔質層が設けら

(7)れてなる乾式分析素子が用いられる場合には、試料の滴下及び信号の測定は多孔質層側から行われるものであり、光透過性支持体上に基質を内蔵した多孔質層が設けられ、その上に光反射性層が設けられてなる乾式分析素子が用いられる場合には、試料の滴下は光反射性層側から行われ、信号の測定は光透過性支持体側から行われる。

標識に起因した信号は、吸光度法（比色法）、螢光法または発光法で検出することができ、測定法としては信号の経時的变化を測定するレート測定法または一定時間後の信号を測定するエンドポイント測定法で測定することができる。好ましくは吸光度法であり、吸光度法（比色法）では紫外線、可視光、近赤外光を利用することができ、例えば流体試料として血清及び血漿を用いる場合には、血清及び血漿による吸光の影響を小さくするために緑色光、赤色光または近赤外光を利用するのが好ましい。

乾式分析素子は、滴下された液相を展開する為の展開層を有するものであることが好ましい。展

- 23 -

開層は供給された試料液の体積に比例し、液相を展開することが好ましい。展開層の素材としては、多孔質層と同様のものを塗布、製膜、貼付しても良い。

本発明にあっては、展開層内に基質等を内蔵させ、反応層としての役目を持たせても良い。

乾式分析素子には、他の添加剤、例えば緩衝剤、保恒剤、界面活性剤、媒染剤等を目的に応じて添加することができる。

緩衝剤は、特異的結合反応、酵素反応、発色反応等に適したpHとする為含有される。用いることができる緩衝剤としては日本化学会編「化学便覧基礎編」（東京、丸善 1966）pp1312～1320、N. E. Good等；Biochemistry Vol 5、p467（1966）、今村、斎藤；化学の領域、Vol30（2）、p79（1976）、W. J. Ferguson等 Anal. Biochem. Vol 104、p300（1980）等の文献に記載されているものを挙げるができる。具体的な例と

24 -

しては、ホウ酸塩、クエン酸塩、磷酸塩、炭酸塩、トリスバルビツール、グリシン、グッド緩衝剤などが挙げられる。これらの緩衝剤は必要に応じて単独で層を形成させてもよい。

保恒剤は基質発色試薬の保存安定化の為に含有され、酸化防止剤などがある。その物質としては、日本生化学会編「生化学実験口座1、蛋白質の化学1」（東京化学同人 1976）pp66～67、実験と応用「アフィニティクロマトグラフィ」pp16～104、特開昭60 149927号公報などに記載されているものが挙げられる。

具体的例としては、ゼラチン、ゼラチン分解物、アルブミン、シクロデキストリン類、非還元糖類（シュクロース、トレハロース）、ポリエチレングリコール、アミノ酸、各種イオン、アジ化ソーダ等が挙げられる。

界面活性剤としては、前述のものが挙げられる。その他の層中に含有される試薬としては、溶解助剤、ブロッカー試薬などがある。これらの添加剤は必要に応じて適量添加する。媒染剤は、酵素



活性測定のための検出物質を測光部側に集中的に集めたり、検出物質が色素の場合吸光度係数を高めたり、波長をシフトさせる物質であり、検出物質と強い相互作用を示す。カチオン性ポリマー、アニオン性ポリマー及びこれらのポリマーのラテックスが用いられる。

乾式分析素子は、さらに生体試料が血液（全血）の場合に有用な血球分離層、必要に応じて設ける接着層、保護層、タイミング層といった補助層を設けることができる。これらの層は、その機能に応じて設けられるべき位置が決定される。

#### 【実施例】

以下、本発明を実施例によって更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例によって限定されるものではない。

#### （実施例 1）

1-(1)  $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ標識 CRP 抗体の作成

CRP 抗体（ヒツジ IgG、日本バイオテスト研究所社製）20mg を 0.1M のリン酸緩衝液

(8)

(pH 6.5) 2.0ml に溶解し、これに N-( $\epsilon$ -マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミド（同仁化学研究所製）が 2.5mg/ml のジメチルホルムアミド溶液 77 $\mu$ l を加えて、30℃ で 20 分間反応後、5mM の EDTA を含有する 0.1M のリン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したセファデックス G 25 カラムで精製し、マレイミド化した CRP 抗体を得た。

次に、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ（東洋紡社製）が 10.5mg/ml の 0.1M リン酸緩衝液 1.8ml に、前記マレイミド化した CRP 抗体を 13.6mg 含む溶液 3.2ml を加えて、4℃ で 45 時間反応後、0.1M の 2-メルカプトエチルアミン 175 $\mu$ l を加えて 30℃ で 20 分間反応させ、0.15M の塩化ナトリウムを含有する 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化したスーパーローズ 6 プレップグレード（ファルマシア社製）カラムで分離、精製し、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ標識 CRP 抗体を得た。

1-(2) CRP 抗体固定化オイバーギット C の

- 27 -

#### 合成

オイバーギット C（ロームファーマ社製）3g を 0.15M の塩化ナトリウムを含有する 0.1M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 40ml 中に分散し、これに CRP 抗体（ヒツジ IgG、日本バイオテスト研究所社製）136mg を入れ、4℃ で 20 時間攪拌し反応させる。反応後、濾取し、0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) と 0.1M の炭酸緩衝液 (pH 8.0) を交互に用い、充分洗浄した。

次いで、水洗した後、経口 38 $\mu$ m のメッシュでふるいをかけた。オイバーギット C の非特異的結合部位をブロックする為、上記のふるいをかけたオイバーギット C を 3% スキムミルク添加の 0.15M の塩化ナトリウムを含有する 0.1M のリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で 4℃、20 時間攪拌した。次いで水洗し、CRP 抗体固定化オイバーギット C を得た。

#### 1-(3) 乾式分析素子の作成

厚さ 180 $\mu$ m の透明な下引き済ポリエチレン

28 -

テレフタレートフィルムの上に、下記の組成の塗布液(1)を塗布し、乾燥させ、ゼラチン層を作成させた。

#### 塗布液-(1)

脱イオン化ゼラチン	6.0g
トライトン X-100	0.15g
1,2-ビス(ビニルスルホニル)エタン	0.01g
純水	54.0g

次に、塗布液-(2)を前記ゼラチン層の上に塗布し、乾燥した。

#### 塗布液-(2)

粉末ろ紙 C（東洋濾紙社製）	21.6g
ビロリドン-酢酸ビニル(2対8)共重合体	11.0g
クロロフェニルレッド $\beta$ -D ガラクトピラノシド（ベーリンガー社製）	356mg
n-ブタノール	49.5g

これを 1.5cm × 1.5cm の大きさに裁断し、乾式分析素子 1 とした。

- 29 -

30 -

## 1-(4) 乾式分析素子1を用いてのCRP測定

1 mMの塩化マグネシウム及び3重量%のウシ血清アルブミンを含有する0.3 Mのピストリス緩衝液190  $\mu$ lに、CRP抗体固定化オイバークットC15 mg、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ標識CRP抗体(10  $\mu$ g/ml)25  $\mu$ l、CRP溶液(0、3、10、30、100、300  $\mu$ g/ml)7  $\mu$ lを添加混合し、室温で12分間免疫反応させる。

反応後の混合液を口径0.2  $\mu$ mのセルロースアセテートメンブランフィルター(ミリポア社製)で濾過し、その濾液の10  $\mu$ lを前記1-(3)で作成した乾式分析素子1に滴下した。

37℃で7分間インキュベートしながら、支持体側から546 nmの反射濃度を測定した。

3分30秒~7分の反射濃度差( $\Delta D_r$ )を用いて検量線を作成した結果を第1図に示す。すなわち、第1図は本発明の免疫測定方法により作成されたCRPの検量線を示すグラフであり、横軸はCRP量( $\mu$ g/ml)を、縦軸は反射濃度差

- 31 -

抗テオフィリン抗体(マウス、IgG、ケンブリッジ・メディカル・テクノロジー社製)10 mgを用い、前記1-(2)と同様な手段を用いて抗テオフィリン抗体固定化オイバークットを作成した。

## 2-(3) テオフィリンの測定

1 mM塩化マグネシウム及び3重量%ウシ血清アルブミンを含有する0.3 Mピストリス緩衝液190  $\mu$ lに、前記2-(2)で合成した抗テオフィリン抗体固定化オイバークットC15 mg、2-(1)で合成した $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ標識テオフィリン(10  $\mu$ g/ml)25  $\mu$ l、テオフィリン溶液(0、5、10、20、40、80  $\mu$ g/ml)を添加混合し、室温で12分間免疫反応させる。

反応後の混合液を口径0.2  $\mu$ mのセハロースアセテートメンブランフィルター(ミリポア社製)で濾過し、その濾液10  $\mu$ lを前記1-(3)で作成した乾式分析素子1に滴下した。

37℃で7分間インキュベートしながら、支持体側から546 nmの反射濃度を測定した。

33 -

(9) ( $\Delta D_r$ )を示す。

この結果から、本発明は操作も簡便であり、測定時間も約20分と従来に比べて短時間でCRPが測定可能である。

## (実施例2)

2-(1)  $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ標識テオフィリンの合成

8-プロピルカルボキシテオフィリン10 mgをジメチルホルムアミド2 mlに溶解し、これにn-ヒドロキシサクシイミド6 mg及び水溶性カルボジイミド10 mgを加え、室温で2時間反応後、0.1 M炭酸水素ナトリウム水溶液2 mlに溶解した $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ10 mgを添加し、室温にて1時間反応させ、そして0.15 Mの塩化ナトリウムを含有する0.1 Mリン酸緩衝液(pH 6.5)で平衡化したセファデックスG25カラムで分離精製し、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ標識テオフィリンを得た。

## 2-(2) 抗テオフィリン抗体固定化オイバークットの合成

3分30秒~7分の反射濃度差( $\Delta D_r$ )を用いて検量線を作成した結果を第2図に示す。すなわち、第2図は本発明の免疫測定方法により作成されたテオフィリンの検量線を示すグラフであり、横軸はテオフィリン量( $\mu$ g/ml)を、縦軸は反射濃度差( $\Delta D_r$ )を示す。

この結果から、本発明は操作も簡便であり、測定時間も約20分と従来に比べて短時間で競合法によりテオフィリンの測定が可能である。

## (実施例3)

3-(1) CRP固定化オイバークットCの合成  
CRP10 mgを用い、前記1-(2)と同様な手段で、CRP固定化オイバークットCを作成した。

## 3-(2) CRPの測定

1 mM塩化マグネシウム及び3重量%ウシ血清アルブミンを含有する0.3 Mピストリス緩衝液190  $\mu$ lにCRP固定化オイバークットC15 mg、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ標識CRP抗体(10  $\mu$ g/ml)25  $\mu$ l、CRP溶液(0、3、10、30、100、300  $\mu$ g/ml)7

34 -

$\mu$ lを添加混合し、室温で12分間免疫反応させる。

反応後の混合液を口径0.2 $\mu$ mのセハロースアセテートメンブランフィルター（ミリポア社製）で濾過し、その濾液10mlを前記1-(3)で作成した乾式分析素子1に滴下した。

37℃で7分間インキュベートしながら、支持体側から546nmの反射濃度を測定した。

3分30秒～7分の反射濃度差( $\Delta Dr$ )を用いて検量線を作成した結果を第3図に示す。すなわち、第3図は本発明の免疫測定方法により作成されたCRPの検量線を示すグラフであり、横軸はCRP量( $\mu$ g/ml)を、縦軸は反射濃度差( $\Delta Dr$ )を示す。

この結果から、本発明は操作も簡便であり、測定時間も約20分と従来に比べて短時間でCRPの測定が可能である。

#### 〔実施例4〕

4-(1) HBs抗原固定化ラテックスの合成  
粒径10 $\mu$ mのラテックス（市販品）100m

(10)

gを0.15Mの塩化ナトリウムを含有する0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)10ml中に分散し、これにHBs抗原(500 $\mu$ g/ml)10mlを入れ、37℃で1時間マグネットスカラーにより攪拌する。そして、0.15Mの塩化ナトリウムを含有する0.1Mのリン酸緩衝液(pH7.4)で洗浄後、2%BSA添加の0.15Mの塩化ナトリウムを含有する0.1Mのリン酸緩衝液(pH7.4)で、室温下において2時間表面処理をし、HBs抗原固定化ラテックスを得た。

4-(2)  $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ標識HBs抗体の作成

常法に従いウサギを免疫することにより得たHBs抗体を用い、前記1-(1)と同様な手段で、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ標識HBs抗体を得た。

4-(3) HBs抗体の測定

1mM塩化マグネシウム及び3重量%ウシ血清アルブミンを含有する0.3Mのピストリス緩衝液190 $\mu$ lに、HBs抗原固定化ラテックス1

- 35 -

0mg、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ標識HBs抗体(10 $\mu$ g/ml)25 $\mu$ l、HBsポジティブ試料を上記緩衝液で300倍、1000倍、3000倍、10000倍、30000倍と希釈した溶液25 $\mu$ lを添加混合し、室温で12分間免疫反応させる。

反応後の混合液を10000r.p.mで3分間遠心分離した後、その上清10mlを前記1-(3)で作成した乾式分析素子1に滴下した。

37℃で7分間インキュベートしながら、支持体側から546nmの反射濃度を測定した。

3分30秒～7分の反射濃度差( $\Delta Dr$ )を用いて検量線を作成した結果を第4図に示す。すなわち、第4図は本発明の免疫測定方法により作成されたHBsの検量線を示すグラフであり、横軸は試料濃度を、縦軸は反射濃度差( $\Delta Dr$ )を示す。

この結果から、本発明は操作も簡便であり、測定時間も約20分と従来に比べて短時間でHBsの測定が可能である。

- 37 -

36 -

#### 〔実施例5〕

5-(1)  $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ標識抗-HBs抗体抗体

常法に従い、マウスを免疫することにより得た抗-HBs抗体抗体を用い、前記1-(1)と同様な手段で、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ標識抗-HBs抗体抗体を得た。

5-(2) HBs抗体の測定

1mM塩化マグネシウム及び3重量%ウシ血清アルブミンを含有する0.3Mピストリス緩衝液200 $\mu$ lに前記4-(1)で合成したHBs抗原固定化ラテックス10mg、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ標識抗-HBs抗体抗体(10 $\mu$ g/ml)25 $\mu$ l、HBs抗体ポジティブ試料を上記緩衝液で、300倍、1000倍、3000倍、10000倍、30000倍と希釈した溶液25 $\mu$ lを添加混合し、室温で12分間免疫反応させる。

反応後の混合液を10000r.p.mで3分間遠心分離した後、その上清10mlを前記1-(3)で作成した乾式分析素子1に滴下した。

33

37℃で7分間インキュベートしながら、支持体側から546nmの反射濃度を測定した。(11)

3分30秒～7分の反射濃度差( $\Delta D_r$ )を用いて検量線を作成した結果を第5図に示す。すなわち、第5図は本発明の免疫測定方法により作成されたHBs抗体の検量線を示すグラフであり、横軸は試料濃度を、縦軸は反射濃度差( $\Delta D_r$ )を示す。

この結果から、本発明は操作も簡便であり、測定時間も約20分と従来に比べて短時間でHBs抗体の測定が可能である。

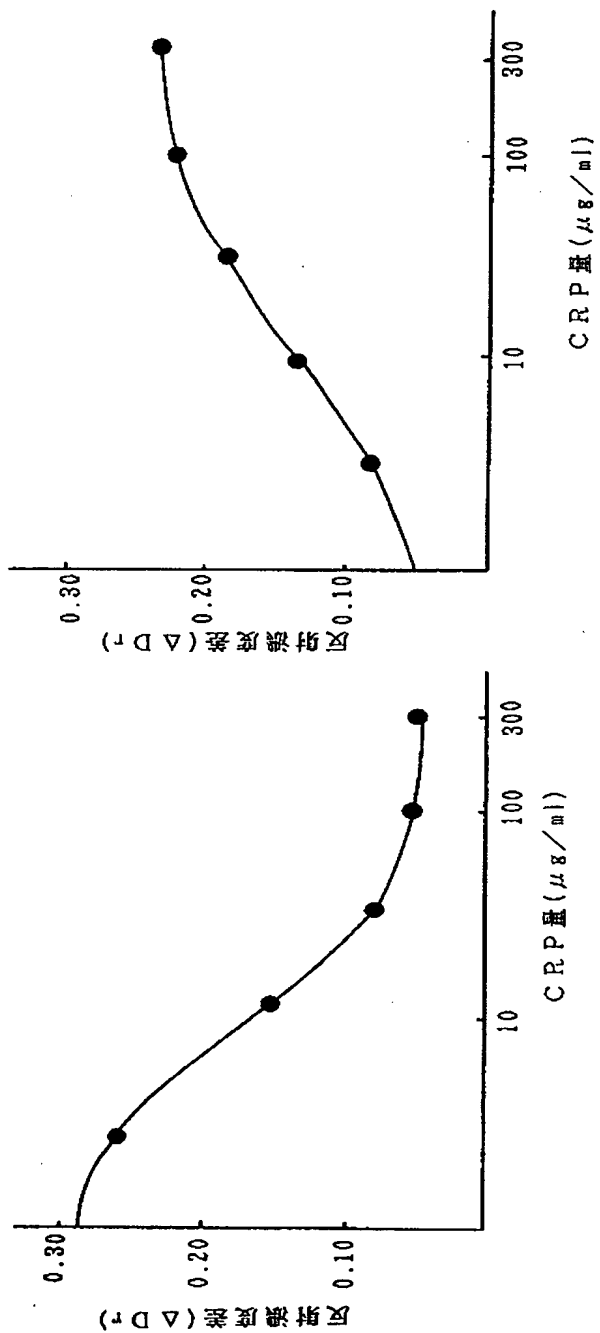
#### 【効果】

本発明の免疫測定方法によれば、流体試料中の特定成分を、短時間で、簡便に、かつ、正確に定量することができる特長を有する。

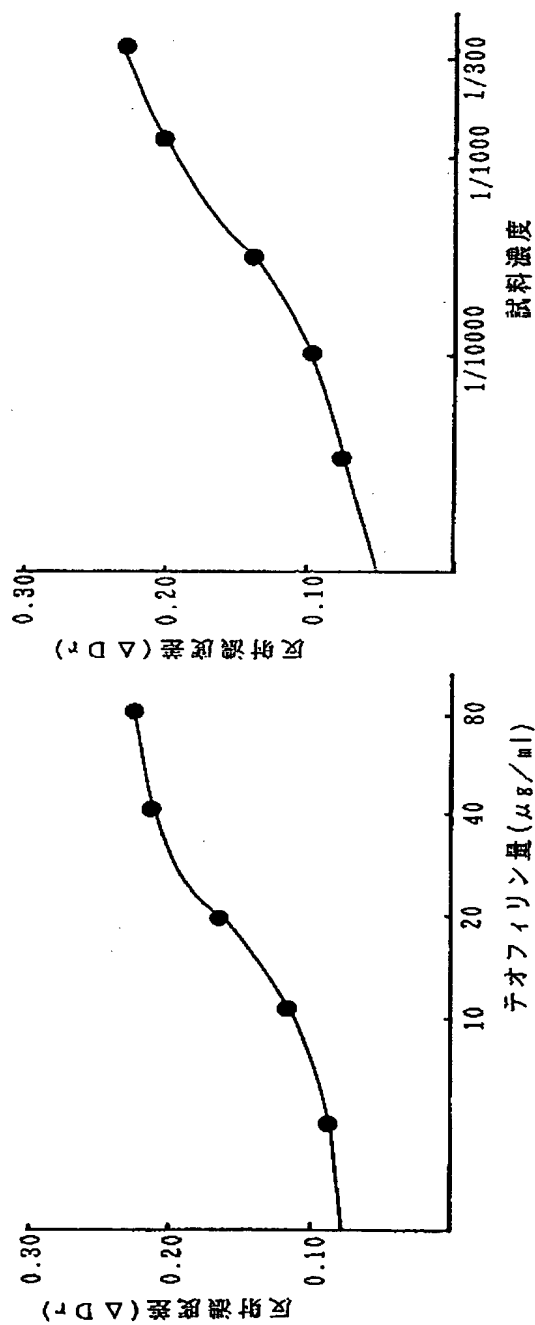
#### 4. 図面の簡単な説明

第1図～第5図は、本発明に係る第1実施例～第5実施例で作成された検量線を示すグラフである。

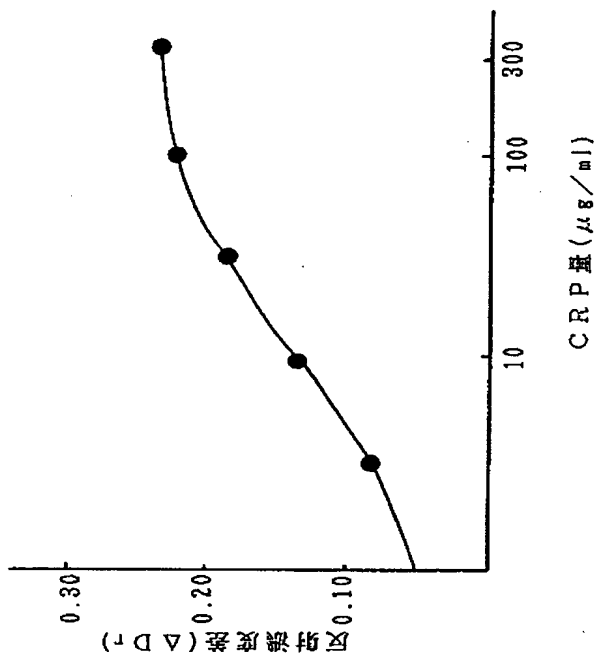
(12)



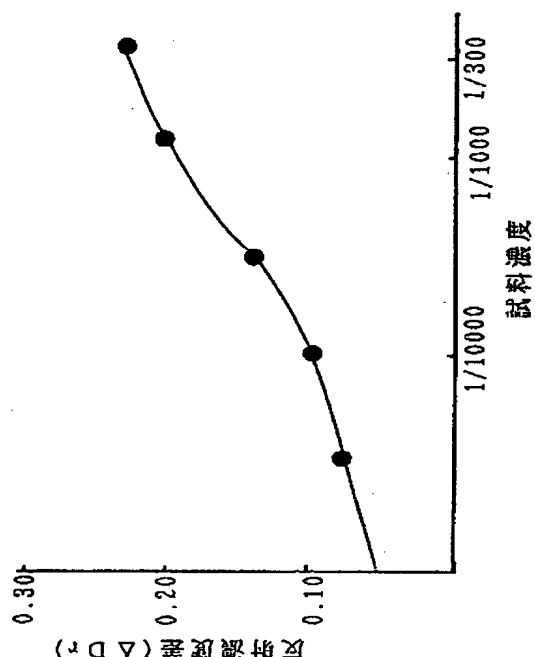
第 1 図



第 2 図

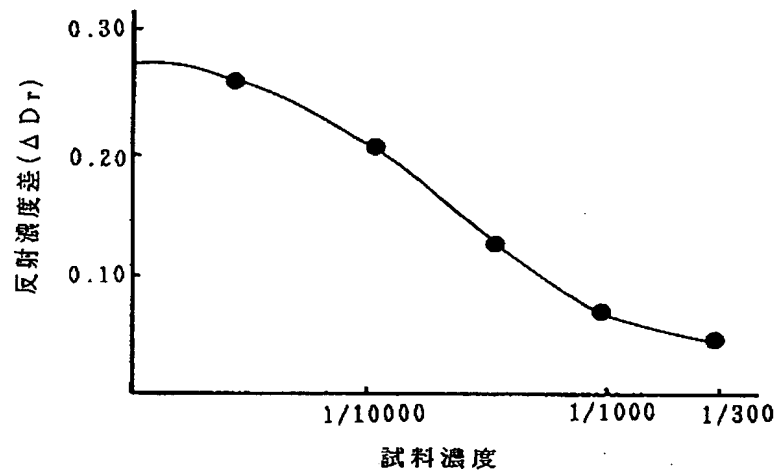


第 3 図



第 4 図

(13)



第 5 図